

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有權機關
國際事務局



(43) 國際公開日
2004 年 5 月 27 日 (27.05.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/044214 A1

- (51) 国際特許分類: C12P 17/14, C07D 273/00, A61K 31/395, A61P 33/00, 43/00 (74) 代理人: 小林 和憲 (KOBAYASHI, Kazunori); 〒170-0004 東京都豊島区北大塚2丁目2番1号 太陽生命大塚ビル3階 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2002/011777 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(22) 国際出願日: 2002 年11 月12 日 (12.11.2002) (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 社団法人北里研究所 (THE KITASATO INSTITUTE) [JP/JP]; 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 大村 智 (OMURA, Satoshi) [JP/JP]; 〒157-0076 東京都世田谷区岡本三丁目3番12号 Tokyo (JP). 塩見 和朗 (SHIOMI, Kazuro) [JP/JP]; 〒150-0013 東京都渋谷区恵比寿一丁目2番7号小野ビル202 Tokyo (JP). 増間 諒郎 (MASUMA, Rokuro) [JP/JP]; 〒108-0073 東京都港区三田四丁目7番13-102号 Tokyo (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

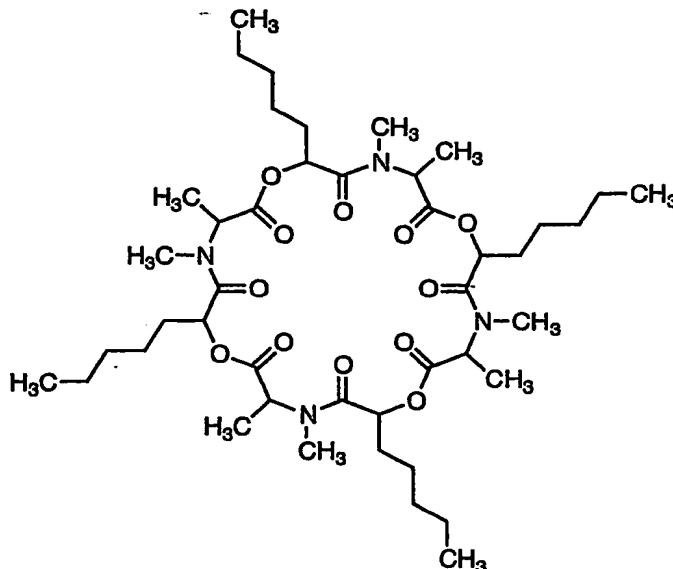
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類：
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL SUBSTANCE FKI-1033 AND PROCESS FOR PRODUCING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規FKI-1033物質およびその製造法



(I)

(57) Abstract: A microorganism capable producing a substance FKI-1033 represented by the following formula: is cultured in a medium to accumulate the FKI-1033 in the culture medium and then the FKI-1033 is collected from the culture medium. Because of having ryanodine antagonism, insecticidal activity and anti-parasitic worm activity, the thus obtained FKI-1033 is expected as being useful as a chemical having satisfactory efficaciousness, toxicity, etc. and being applicable to pesticides, veterinary medicines and medicines.

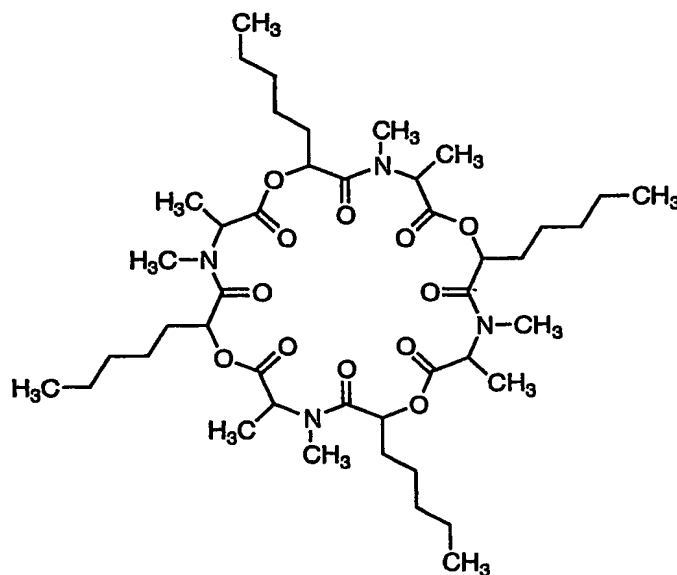
〔統葉有〕

WO 2004/04214 A1



(57) 要約:

下記式



で表されるFKI-1033物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養物中にFKI-1033物質を蓄積せしめ、該培養物からFKI-1033物質を採取するものであって、得られたFKI-1033物質はリアノジン拮抗活性、殺虫活性および抗蠕虫活性を有し、有効性、毒性などの面で満足し得る農薬、動物薬、医薬品として有効な薬剤であると期待される。

明 細 書

新規FKI-1033物質およびその製造法

技術分野

本発明はリアノジン拮抗活性、殺虫活性及び蠕虫活性を有することから農薬、動物薬及び医薬品として有効な新規FKI-1033物質およびその製造法に関する。

背景技術

殺虫剤が食糧資源の増産や安定した供給に多大な貢献を果してきたことは確かであるが、一方では残留毒性や生態系の破壊など大きな問題も引き起こしてきたことは周知の通りである。このような事情を考慮して安全性の高い殺虫剤の開発が進められ、今日では毒性などの面でもかなり配慮された殺虫剤が利用されるようになってきている。

また、寄生虫症は衛生環境の改善、駆虫薬の進歩などにより減少してきたが、近年になって輸入寄生虫症、人獣共通寄生虫症、日和見寄生虫症、生鮮食品に由来する寄生虫症などが目立つようになり、改めて多種にわたる寄生虫症が問題となっている。さらに寄生虫症は、牧畜や農業においても多大な経済的負担をもたらしている。寄生虫の中で蠕虫の感染症については、現在、イベルメクチン、メベンダゾール及びプラジカンテルなどの化合物が高頻度で使用されている。

しかし、現在使用されている殺虫剤や抗蠕虫剤がその有効性、毒性などの面ですべて満足できるとはいい難く、新しい薬剤の開発が強く要望されている。

発明の開示

リアノジンレセプターは、細胞質の Ca^{2+} 濃度上昇により細胞内ストアから細胞質に Ca^{2+} を動員するイオンチャンネルであり、植物アルカロイドで殺虫活性を示すリアノジンのレセプターとして発見された。哺乳類においては、遺伝子

クローニングの成果から別々の遺伝子にコードされる1型（骨格筋型）、2型（心筋型）及び3型（脳型）の3種類のリアノジンレセプターが知られ、それぞれの一次構造も既に明らかとなっているが（Takeshima, H. : Ann. N. Y. Acad. Sci., 707, 165-177 (1993)、昆虫や蠕虫においては上記3種類のいずれにも属さないリアノジンレセプターとして同定されている（竹島浩：蛋白質、核酸、酵素、第43巻、1603-1609頁、1998年）。

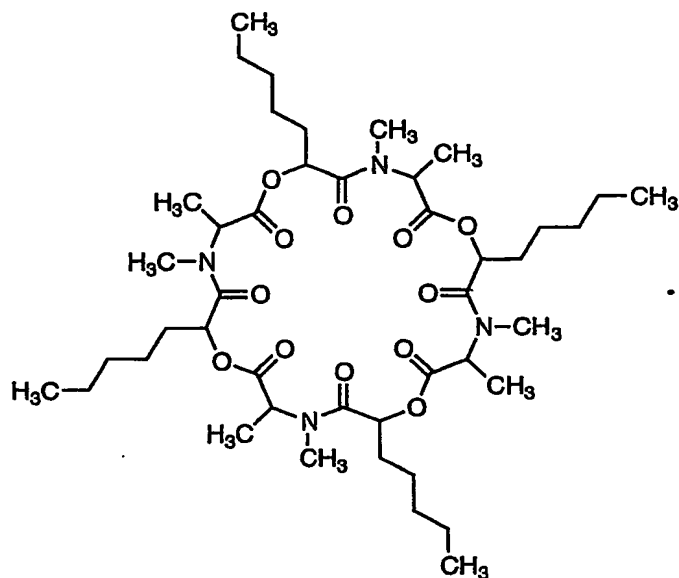
したがって、リアノジンレセプターに対してリアノジンと拮抗する物質の中で昆虫や蠕虫に対する選択性の高いものは、殺虫剤や抗蠕虫剤として期待されることが報告された（M. Schmittら：Pesticide Sci. 第48巻、375-385頁、1996年）。

そこで、本発明者らはこのリアノジンレセプターに着目し、薬剤の有効性、毒性などの面において満足できる新しい薬剤を得るため、微生物培養物中からリアノジン拮抗剤の探索を続けた結果、糸状菌FKI-1033株の生産する新規化合物のFKI-1033物質がリアノジン拮抗活性を有すること、さらに殺虫活性や抗蠕虫活性を有することを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

本発明はリアノジン拮抗活性、殺虫活性および抗蠕虫活性を有し、有効性、毒性などの面で満足し得る農薬、動物薬、医薬品として有効な新規FKI-1033物質およびその製造法を提供することを目的とするものである。

本発明のFKI-1033物質は糸状菌に属するFKI-1033物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養物中にFKI-1033物質を蓄積せしめ、該培養物からFKI-1033物質を採取するものである。

すなわち本発明は、下記式



で表される新規FKI-1033物質を提供するものである。

更に本発明は、糸状菌に属し、FKI-1033物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養物中にFKI-1033物質を蓄積せしめ、該培養物からFKI-1033物質を採取することを特徴とする新規FKI-1033物質の製造法を提供するものである。

更に本発明は、糸状菌に属するバーチシリウム エスピー (*Verticillium* sp.) FKI-1033 (FERM BP-8219) である微生物を提供するものである。

更に本発明は、FKI-1033物質を生産する能力を有する微生物が糸状菌に属するバーチシリウム エスピー (*Verticillium* sp.) FKI-1033であるFKI-1033物質を提供するものである。

更に本発明は、微生物が糸状菌に属するバーチシリウム エスピー (*Verticillium* sp.) FKI-1033 (FERM BP-8219) であるFKI-1033物質を提供するものである。

更に本発明は、FKI-1033物質を生産する能力を有する微生物が糸状菌に属するバーチシリウム エスピー (*Verticillium* sp.) FKI-1033 (FERM BP-8219) または上記物質を生産する能力を

有するその変異株である製造法を提供するものである。

更に本発明は、リアノジン拮抗活性を有するFKI-1033物質、及び殺虫活性及び抗蠕虫活性を有するFKI-1033物質を提供するものである。

更に本発明は、FKI-1033物質を有効成分とするリアノジン拮抗剤、殺虫剤及び抗蠕虫剤を提供するものである。

更に本発明は、リアノジンレセプターに対してリアノジンと拮抗する物質の中で殺虫活性および抗蠕虫活性を有する農薬、動物薬、医薬製造のためのFKI-1033物質の使用を提供するものである。

最後に本発明は、リアノジンレセプターに対してリアノジンと拮抗する物質の中で殺虫活性および抗蠕虫活性を有する農薬、動物薬、医薬製造のためのFKI-1033物質を提供するものである。

前記の式で表される新規FKI-1033物質を生産する能力を有する微生物（以下「FKI-1033物質生産菌」と称する）は糸状菌であるが、本発明のFKI-1033物質生産能を有するものであればよく、特に制限されることはない。本発明のFKI-1033物質を生産するために使用される菌株の好ましい一例としては、本発明者らによって例えば鹿児島県の土壌より新たに分離された*Verticillium* sp. FKI-1033株が挙げられる。本菌株の菌学的性状を示すと以下の通りである。

（１）形態的特徴

本菌株は、バレイショ・ブドウ糖寒天培地、コーン・ミール寒天培地、三浦寒天培地、麦芽汁寒天培地、オートミール寒天培地などで中程度に生育し、各種寒天培地で分生子の着性は良好であった。

麦芽汁寒天培地に生育したコロニーを顕微鏡で観察すると、菌糸は隔壁を有しており、分生子柄は気菌糸より直立し、ときに分岐することがある。フィアライドは、気菌糸から直接あるいは分生子柄の途中および先端に単独あるいは２～４本輪生して生じる。その長さは２５～８０μm、基部はわずかに膨らみ（２．０～２．８μm）、先端は錐形に細くなる。フィアライドの先端からは亜球形か

ら広楕円形（ $2.5 \sim 4.0 \times 2.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$ ）の分生子を生じ、粘性球形を形成する。

（２）各種寒天培地上での培養性状

本菌株を各種寒天培地上で、 25°C 、７日間培養した場合の肉眼的観察結果を下記の第１表に示した。

第１表

培地	培地上の生育状態 (コロニーの直径)	コロニー表面 の色調	コロニー裏面 の色調	可溶性色素
バレイショ・ブドウ糖寒天培地				
	中程度（ $4.2 \sim 4.4 \text{ mm}$ ） 羊毛状～ビロード状 周辺平滑	白色	薄黄褐色	なし
コーン・ミール寒天培地				
	中程度（ $3.9 \sim 4.2 \text{ mm}$ ） 粉状～ビロード状 周辺平滑	白色	薄黄褐色	なし
三浦寒天培地				
	中程度（ $4.4 \sim 4.5 \text{ mm}$ ） 粉状～ビロード状 周辺平滑	白色	白色	なし
麦芽汁寒天培地				
	中程度（ $4.2 \sim 4.6 \text{ mm}$ ）	白色	白色～	なし

羊毛状～ビロード状

薄黄褐色

周辺平滑

オートミール寒天培地

中程度 (4.3～4.6 mm)

白色

白色

なし

羊毛状～ビロード状

周辺平滑

(3) 生理的性状

(1) 最適生育条件

本菌株の最適生育条件は、pH 5～7、温度 18.5～29.0℃である。

(2) 生育の範囲

本菌株の生育範囲は、pH 4～10、温度 6.5～31.0℃である。

(3) 好気性、嫌気性の区別

好気性

上記FKI-1033株の形態的特徴、培養性状および生理的性状に基づき、既知菌種との比較を試みた結果、本菌株はバーチシリウム (*Verticillium*) 属に属する一菌株と同定し、バーチシリウム エスピー FKI-1033と命名した。本菌株は、特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約に基づき国際寄託した。本菌株はバーチシリウム エスピー FKI-1033 (*Verticillium* sp. FKI-1033) として、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6 (郵便番号305-8566) [AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566 Japan] に所在する独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (International Patent Organi

sm Depository National Institute of Advanced Industrial Science and Technology) に寄託され、寄託日は平成14年(2002)10月21日、受託番号はFERM BP-8219である。

本発明のFKI-1033物質を製造するに当たっては、先ず糸状菌に属するFKI-1033物質生産菌を培地で培養し、その培養物から分離・精製すればよい。菌は一般的性状として菌学上の性状は極めて変異し易く、一定したものではなく、自然的にあるいは通常行われる紫外線照射または変異誘導体、例えばN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン、エチルメタンスルホネート等を用いる人工変異株は勿論、自然的変異株も含め、糸状菌に属し前記式で表されるFKI-1033物質生産菌のすべてが使用できる。

上記FKI-1033物質生産に適した栄養源としては、糸状菌の栄養源として使用し得るものであればよい。例えば、市販のペプトン、肉エキス、コーン・スティーブ・リカー、綿実粉、落花生粉、大豆粉、酵母エキス、NZ-アミン、カゼインの水和物、硝酸ソーダ、硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の窒素源、グリセリン、澱粉、グルコース、ガラクトース、マンノース等の炭水化物、あるいは脂肪等の炭素源、及び食塩、リン酸塩、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム等の無機塩を単独あるいは組み合わせて使用できる。

その他必要に応じて微量の金属塩、消泡剤として動・植・鉱物油等を添加することもできる。これらのものは生産菌が利用しFKI-1033物質の生産に役だつものであればよく、公知の糸状菌の培養材料は、すべて用いることができる。またFKI-1033物質の大量培養には液体培養が好ましく、培養温度は生産菌が発育し、FKI-1033物質を生産できる範囲で適用できる。培養は以上に述べた条件を使用するFKI-1033物質生産菌の性質に応じて適宜選択して行なうことができる。

FKI-1033物質は、培養液よりクロロホルム、酢酸エチル等の水不混和性の有機溶媒で抽出することができる。上述の抽出法に加え、脂溶性物質の採

取に用いられる公知の方法、例えば吸着クロマトグラフィー、分配クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーよりのかき取り、遠心向流分配クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等を適宜組合わせあるいは繰返すことによって純粹に採取することができる。

本発明によるFKI-1033物質の理化学的性状は次の通りである。

- (1) 性状 : 無色油状、
- (2) 分子量 : 875.5397 (M+Na、高分解能高速原子衝撃質量分析による)、
- (3) 分子式 : $C_{44}H_{76}N_4O_{12}$ 、
- (4) 比旋光度 : $[\alpha]_D^{25} = -53.0^\circ$ ($c = 0.2$ 、メタノール)、
- (5) 紫外外部吸収スペクトル : メタノール中で測定した紫外外部吸収スペクトルは、202 nm ($\epsilon = 19700$) に極大吸収を有する、
- (6) 赤外部吸収スペクトル : 臭化カリウム錠剤法で測定した赤外部吸収スペクトルは、3467、2956、2933、2862、1743、1662、1464、1416、1205、1084 cm^{-1} に極大吸収を有する、
- (7) 1H プロトン核磁気共鳴スペクトル (重メタノール中) の測定には、米国バリアン社製ユニティ・イノバ600核磁気共鳴スペクトルメータを用いて測定した。その化学シフト (ppm) およびスピン結合定数 (Hz) を第2表に示す、
- (8) ^{13}C 核磁気共鳴スペクトル (重メタノール中) の測定には、米国バリアン社製ユニティ・イノバ600核磁気共鳴スペクトルメータを用いて測定した。その化学シフト (ppm) を第2表に示す、
- (9) 溶剤に対する溶解性 : メタノール、エタノール、酢酸エチル、クロロホルムに可溶、水、n-ヘキサンに難溶、
- (10) 呈色反応 : 硫酸に陽性。

第2表

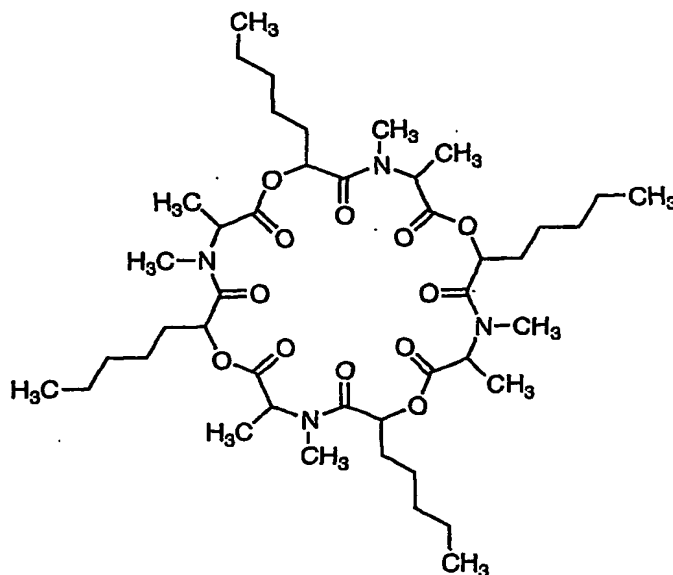
^{13}C	^1H
1 7 1. 2 s	
1 7 1. 0 s	
1 7 0. 8 s $\times 4$	
1 7 0. 0 s	
1 6 9. 9 s $\times 2$	
1 6 9. 8 s	
1 6 9. 3 s $\times 3$	
1 6 9. 2 s	
7 1. 6 d	5. 1 1 d d (1 H, $J=2. 5, 10. 6$)
7 1. 3 d $\times 3$	5. 4 2 m (3 H)
7 1. 0 d	5. 4 5 d d (1 H, $J=5. 3, 8. 4$)
7 0. 8 d	5. 3 6 d d (1 H, $J=5. 3, 9. 0$)
7 0. 7 d	5. 3 2 d d (1 H, $J=3. 3, 10. 1$)
5 4. 4 d	4. 5 6 q (1 H, $J=7. 3$)
5 1. 9 4 d $\times 3$	5. 4 0 q (3 H, $J=7. 2$)
5 1. 8 5 d	5. 5 4 q (1 H, $J=7. 4$)
5 1. 7 6 d	5. 3 0 q (1 H, $J=7. 4$)
5 1. 5 d	5. 5 3 q (1 H, $J=7. 3$)
3 1. 5 q	3. 1 8 s (3 H)
3 1. 4 0 t $\times 5$	1. 3 1 m (10 H)
3 1. 3 6 t $\times 2$	1. 3 0 m (4 H)
3 1. 2 t	1. 7 8 m (2 H)
3 1. 1 t	1. 7 8 m (2 H)
3 1. 0 t $\times 3$	1. 7 8 m (6 H)

3 0 . 9 8 t	1 . 7 8 m (2 H)
3 0 . 9 7 q	2 . 9 6 s (3 H)
3 0 . 9 2 t	1 . 7 8 m (2 H)
3 0 . 7 3 q × 3	2 . 9 1 s (9 H)
3 0 . 6 6 q	3 . 0 1 s (3 H)
2 9 . 4 q	2 . 8 9 s (3 H)
2 5 . 1 t	1 . 3 0 m (2 H)
2 4 . 8 3 t	1 . 3 0 m (2 H)
2 4 . 8 2 t	1 . 3 0 m (2 H)
2 4 . 7 6 t × 4	1 . 3 0 m (8 H)
2 2 . 4 2 t × 4	1 . 3 0 m (8 H)
2 2 . 3 9 t × 3	1 . 3 0 m (6 H)
1 5 . 9 q	1 . 5 9 d (3 H , J = 7 . 3)
1 5 . 0 q	1 . 4 1 d (3 H , J = 7 . 4)
1 4 . 8 q	1 . 4 5 d (3 H , J = 7 . 3)
1 4 . 2 q × 3	1 . 3 8 d (9 H , J = 7 . 2)
1 4 . 0 q	1 . 3 9 d (3 H , J = 7 . 4)
1 3 . 9 3 q × 3	0 . 8 8 m (9 H)
1 3 . 9 0 q	0 . 8 8 m (3 H)
1 3 . 8 8 q × 3	0 . 8 8 m (9 H)

ただし、表中の記号、sは一重線、dは二重線、tは三重線、qは四重線、mは多重線、Hはプロトンの数、Jはスピン結合定数（Hz）を示す。

以上、本発明のFKI-1033物質の各種理化学的性状やスペクトルデータを詳細に検討した結果、本FKI-1033物質は下記式で表される化学構造であることが決定された。なお、FKI-1033物質はプロトン及び¹³C核磁気共鳴スペクトルにおいて、分子式の1.75倍のシグナル強度を示した。これ

はFKI-1033物質がおよそ3:4の割合で2種類の配座異性体として存在しているためと考えられる。なお片方の配座異性体については、シグナルの数が4分の1しか観測されず、4回回転対称性をもつ立体配座をとっていることが示唆された。



以上のとおり、FKI-1033物質の各種理化学的性状について詳述したが、このような性質に一致する化合物はこれまで報告されておらず、FKI-1033物質は新規物質であると決定した。

次に、本発明FKI-1033物質のリアノジン拮抗活性について詳しく説明する。

(1) 昆虫粗リアノジンレセプター画分の調製は以下のように行った。

ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) 成虫10匹の胸と脚を液体窒素で凍らせ細かく細断し、 $4\mu\text{g}/\text{ml}$ ロイペプチン、 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ ペプタチンを含む15mlの50mMトリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) 中でナイフホモジナイザーを用い、 0°C 、24,000rpmで30秒間×3回ホモジナイズした。これを二重にした綿布で濾過し、得られた濾液を 4°C 、3,000rpmで20分間遠心した。得られた上清を 4°C 、30,000rpmで

30分間遠心し、得られた沈殿を0.3Mシヨ糖、500 μ M塩化カルシウム、1.5M塩化カリウムを含む1mlの20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)中で懸濁してガラスポッターでホモジナイズし、粗リアノジンレセプター画分を得た。この粗リアノジンレセプター画分は使用する直前に緩衝液A[4 μ g/mlアプロチニン、4 μ g/mlロイペプチン、0.3Mシヨ糖、500 μ M塩化カルシウムを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)]で約7倍に希釈して用いた。

(2) 哺乳類粗リアノジンレセプター画分の調製は以下のように行った。

ICRマウス1匹の後脚筋肉を細かく細断し、その3.0gを15mlの緩衝液B[4 μ g/mlアプロチニン、4 μ g/mlロイペプチンを含む20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)]中でガラスホモジナイザーを用い、0℃、1000rpmで30秒間×3回ホモジナイズした。これをマイクロテストチューブに移し、更にガラスホモジナイザーを7.5mlの緩衝液Bで洗浄し、その洗浄液もマイクロテストチューブに加えた。これを攪拌後、4℃に保冷した超遠心分離機により25,000gで40分間遠心した。得られた沈殿に2.4mlの緩衝液Bを加えて懸濁し、マウス由来の粗リアノジンレセプター画分を得た。

(3) ワモンゴキブリ粗リアノジンレセプター結合活性の測定は以下のように行った。

96穴マイクロプレート(米国、コーニング社製)に緩衝液A 70 μ l、0.1nMリアノジンのエタノール溶液10 μ l、20nM[9,21-³H](N)]リアノジン10 μ lを加えた。次に、10 μ lのワモンゴキブリ粗リアノジンレセプター画分を加えて反応を開始させ、室温で90分間、マイクロプレートミキサーにより振とうした。次に、その反応液をトムテック社製ハーベスター96MachⅢMを用いてグラスファイバーフィルター(米国、ワラック社製、プリンテッド・フィルターマットB)で濾過後、低温の20mMトリス塩酸緩衝液(pH8.0)300 μ lで3回洗浄した。そのフィルターを電子レンジを

用いて乾燥後、シンチレーターシート（米国、ワラック社製、M e l t i L e x B / H S）を載せてホットプレート上でシートを溶融させた。放射活性は、シンチレーションカウンター（米国、ワラック社製、M i c r o B e t a T r i L u x）を用いてフィルターの蛍光強度を測定することにより測定した。

F K I - 1 0 3 3 物質のリアノジン拮抗活性は、リアノジンレセプター結合活性測定においてははじめにマイクロプレートに F K I - 1 0 3 3 物質を添加しておくことで、コントロールのリアノジンレセプター結合活性と比較して以下の式により算出した。

F K I - 1 0 3 3 物質添加時の放射活性

$$\text{リアノジン拮抗活性} = \left(1 - \frac{\text{F K I - 1 0 3 3 物質添加時の放射活性}}{\text{コントロールの放射活性}} \right) \times 100$$

上記式からの算出結果によれば、F K I - 1 0 3 3 物質はワモンゴキブリ由来リアノジンレセプターに対して $I C_{50} = 4.2 \mu M$ のリアノジン拮抗活性を示した。

（４）哺乳類リアノジンレセプター結合活性の測定は以下のように行った。

96穴マイクロプレート（米国、コーニング社製）に緩衝液 A $70 \mu l$ 、 $0.1 nM$ リアノジンのエタノール溶液 $10 \mu l$ 、 $20 nM$ [$9, 21 - ^3 H$] (N)] リアノジン $10 \mu l$ を加えた。次に、 $10 \mu l$ のマウス由来粗リアノジンレセプター画分を加えて反応を開始させ、室温で90分間、マイクロプレートミキサーにより振とうした。次にその反応液をトムテック社製ハーベスター 96 M a c h I I I M を用いてグラスファイバーフィルター（米国、ワラック社製、プリンテッド・フィルターマット B）で濾過後、低温の $20 mM$ トリス塩酸緩衝液（ $pH 8.0$ ） $300 \mu l$ で3回洗浄した。そのフィルターを電子レンジを用いて乾燥後、シンチレーターシート（米国、ワラック社製、M e l t i L e x B / H S）を載せてホットプレート上でシートを溶融させた。放射活性はシンチレーションカウンター（米国、ワラック社製、M i c r o B e t a T r i L u x）を用いてフィルターの蛍光強度を測定することにより測定した。F K I - 1 0 3

3物質のリアノジン拮抗活性は、リアノジンレセプター結合活性測定においてはじめにマイクロプレートにFKI-1033物質を添加しておくことで、コントロールのリアノジンレセプター結合活性と比較して以下の式により算出した。

FKI-1033物質添加時の放射活性

$$\text{リアノジン拮抗活性} = \left(1 - \frac{\text{FKI-1033物質添加時の放射活性}}{\text{コントロールの放射活性}} \right) \times 100$$

上記式からの算出結果によれば、FKI-1033物質はマウス由来リアノジンレセプターに対して $IC_{50} = 53.9 \mu M$ のリアノジン拮抗活性を示した。

したがって、上記の測定結果から、FKI-1033物質は昆虫リアノジンレセプターに対して哺乳類リアノジンレセプターより10倍以上、強いリアノジン拮抗活性を示すことが確認された。

(5) 本発明のFKI-1033物質の抗菌活性は以下の通りである。

濾紙円板（日本国、アドバンテック社製、直径6mm）にFKI-1033物質の1mg/mlのメタノール溶液をそれぞれ10μl浸漬し、一定時間風乾して溶媒を除去後、各試験菌含菌寒天平板に張り付け、35℃で24時間培養後、濾紙円板の周りにできた生育阻止円の直径を測定した。その測定結果を下記の第3表に示した。

第3表

試験菌	阻止円径 (mm)
スタフィロコッカス アウレウス(Staphylococcus aureus)ATCC6538p	—
バチルス サブチリス(Bacillus subtilis)ATCC6633	—
マイクロコッカス ルテウス(Micrococcus luteus)ATCC9341	—
ミコバクテリウム スメグマチス(Mycobacterium smegmatis)ATCC607	—
エシエリヒア コリ(Escherichia coli)N I H J	—

エシエリヒア コリ(<i>Escherichia coli</i>)	N I H J J C - 2 (IF012734)	-
シュードモナス エルギノーザ(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	IF03080	-
キサントモナス カンペストリス p v. オリゼ		
(<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>oryzae</i>)	K B 8 8	-
バクテロイデス フラジリス(<i>Bacteroides fragilis</i>)	ATCC23745	-
アコレプラズマ レイドロウイ(<i>Acholeplasma laidrawii</i>)	K B 1 7 4	-
カンジダ アルビカンス(<i>Candida albicans</i>)	K F 1	-
サッカロミセス セレビジアエ(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	K F 2 6	-
ピリキュラリア オリゼ(<i>Pyricularia oryzae</i>)	K F 1 8 0	-
アスペルギルス ニガー(<i>Aspergillus niger</i>)	ATCC6275	-
ムコール ラセモサス(<i>Mucor racemosus</i>)	IF04581	-

上記第3表に示すとおり、本発明のFKI-1033物質は各種微生物に対して抗菌活性を示さないことが確認された。

(6) 本発明のFKI-1033物質の抗線虫及び抗節足動物活性について以下に詳しく説明する。

96穴プレート(米国、コーニング社製)に本FKI-1033物質のメタノール溶液を加え、真空ポンプ下でメタノールを留去した後、検定用培地(レチン0.01%、炭酸水素ナトリウム7.5mM、塩化カリウム7.5mM、塩化カルシウム二水和物7.5mM、硫酸マグネシウム七水和物7.5mM)250 μ lを加え、15分間振とうした。

そこに、緩衝液中で孵化させた節足動物*Artemia salina*のノープリウス幼生を数匹含む緩衝液を50 μ l加え、また、線虫増殖用寒天培地上で飼育した線虫*Caenorhabditis elegans*を10匹程度加えた。これらの生物の様子を2日後に顕微鏡下で観察したところ、節足動物および線虫に対していずれも20 μ g/mlの濃度で生育を阻害した。

したがって、本発明のFKI-1033物質はリアノジン拮抗剤あるいは殺

虫剤や抗蠕虫剤などの薬剤として使用し得る。

発明を実施するための最良の形態

次に、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれのみに限定されるものではない。

寒天斜面培地で培養したバーチシリウム エスピー (Verticillium sp.) FKI-1033 株 (FERM BP-8219) より、グルコース 2.0%、ポリペプトン (日本国、日本製薬社製) 0.5%、酵母エキス (日本国、オリエンタル酵母工業社製) 0.2%、寒天 0.1%、リン酸二水素カリウム 0.1%、硫酸マグネシウム七水和物 0.05% からなる液体培地 (pH 6.0) が 100 ml 入った 500 ml 容三角フラスコに 1 白金耳接種し、27℃で3日間振盪培養した。得られた種培養液を滅菌精製水 80 ml が入った 500 ml 容三角フラスコ 4 本に各 20 ml ずつ加えて希釈した。次に、その種培養希釈液を 240 g の生産培地 [イタリア米 150 g、水道水 90 ml、硫酸鉄 (II) 七水和物 0.9 mg、塩化マンガン四水和物 0.9 mg、塩化亜鉛七水和物 0.9 mg、硫酸銅 (II) 五水和物 0.9 mg、塩化コバルト六水和物 0.9 mg] が入った 1 L 容ルーフラスコ 24 本に各 10 ml ずつ植菌し、27℃で13日間静置培養した。

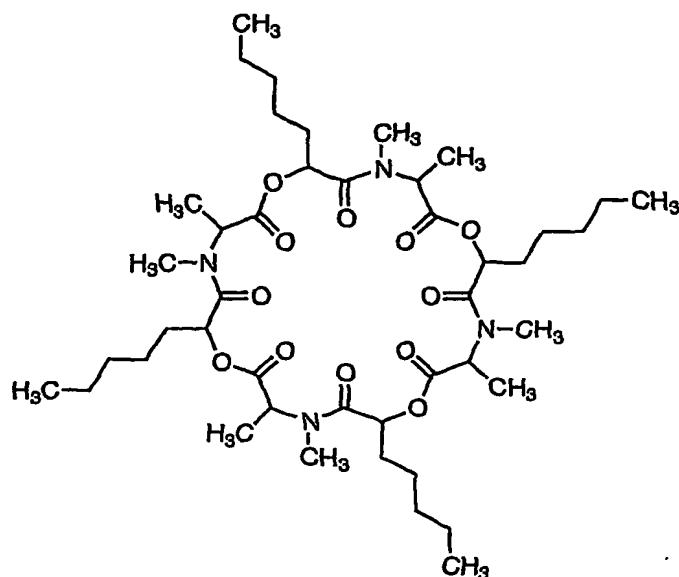
培養の終了した 1 L 容ルーフラスコ 24 本にそれぞれ 200 ml のメタノール : 水 = 2 : 1 の混液 300 ml を加えて激しく攪拌した後、3 時間放置した。次にその抽出液中のメタノールを減圧留去し、得られた水溶液を等量の酢酸エチルで 2 回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水後、濃縮乾固し、2.53 g の茶褐色油状物質を得た。これをヘキサンで充填したシリカゲルカラム (φ 2.8 × 14.0 cm) にのせ、ヘキサン-酢酸エチル (100 : 75) で洗浄後、ヘキサン-酢酸エチル (100 : 150) で溶出し、減圧濃縮により 183 mg の茶褐色油状物質を得た。これをさらにセファデックス LH-20 カラム (φ 2.7 × 92 cm) にかけて、メタノールにより溶出を行うことで、FKI-1033 物質 86.5 mg を無色油状物質として得た。

産業上の利用分野

以上説明したように、糸状菌に属するFKI-1033物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養物中にFKI-1033物質を蓄積せしめ、該培養物から本FKI-1033物質を採取することにより製造され、得られたFKI-1033物質はリアノジン拮抗活性、殺虫活性および抗蠕虫活性を有することから、有効性、毒性などの面で満足し得る農薬、動物薬、医薬品として有効な新規FKI-1033物質であると期待される。

請 求 の 範 囲

1. 下記式



で表される新規FKI-1033物質。

2. 糸状菌に属し、FKI-1033物質を生産する能力を有する微生物を培地で培養し、培養物中にFKI-1033物質を蓄積せしめ、該培養物からFKI-1033物質を採取することを特徴とする新規FKI-1033物質の製造法。

3. 糸状菌に属するバーチシリウム エスピー (*Verticillium* sp.) FKI-1033 (FERM BP-8219) である微生物。

4. 請求の範囲1記載のFKI-1033物質を生産する能力を有する微生物が糸状菌に属するバーチシリウム エスピー (*Verticillium* sp.) FKI-1033であるFKI-1033物質。

5. 微生物が糸状菌に属するバーチシリウム エスピー (Verticillium sp.) FKI-1033 (FERM BP-8219) である請求の範囲 4 記載の FKI-1033 物質。

6. FKI-1033 物質を生産する能力を有する微生物が糸状菌に属するバーチシリウム エスピー (Verticillium sp.) FKI-1033 (FERM BP-8219) または上記物質を生産する能力を有するその変異株である請求の範囲 2 記載の製造法。

7. リアノジン拮抗活性を有する請求の範囲 1 記載の FKI-1033 物質。

8. 殺虫活性及び抗蠕虫活性を有する請求の範囲 1 記載の FKI-1033 物質。

9. FKI-1033 物質を有効成分とするリアノジン拮抗剤。

10. FKI-1033 物質を有効成分とする殺虫剤及び抗蠕虫剤。

11. FKI-1033 物質を有効成分とするリアノジン拮抗剤、殺虫剤及び抗蠕虫剤。

12. リアノジンレセプターに対してリアノジンと拮抗する物質の中で殺虫活性および抗蠕虫活性を有する農薬、動物薬、医薬製造のための FKI-1033 物質の使用。

13. リアノジンレセプターに対してリアノジンと拮抗する物質の中で殺虫活性および抗蠕虫活性を有する農薬、動物薬、医薬製造のための FKI-10

3 3 物質。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/11777

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P17/14, C07D273/00, A61K31/395, A61P33/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P17/00-17/18, C07D273/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2002
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2002	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2002

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	KATAOKA M. et al., Bassianolide, a New Insecticidal Cyclodepsipeptide from Beauveria Bassiana and Verticillium lecanii. Agric.Biol.Chem. 1978, Vol.42, No.3, pages 629 to 635	1-2, 4-5, 7-8, 10-11 3, 6, 9, 12-13
A	SCHMITT M. et al., Binding Sites for Ca ²⁺ -Channel Effectors and Ryanodine in Periplaneta Americana - Possible Targets for New Insecticides. Pestic. Sci. 1996, Vol.48, No.4, pages 375 to 388	1-13
A	EP 382173 A2 (Meiji Seika Kaisha Ltd.), 16 August, 1990 (16.08.90), & JP 3-035796 A & US 5116815 A	1-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
 "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier document but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 December, 2002 (05.12.02)Date of mailing of the international search report
24 December, 2002 (24.12.02)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 17/14, C07D 273/00, A61K 31/395, A61P 33/00, 43/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 17/00-17/18, C07D 273/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS/WPI (DIALOG), CA/REGISTRY (STN), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X — A	KATAOKA M. et al. Bassianolide, a New Insecticidal Cyclodepsipeptide from <i>Beauveria bassiana</i> and <i>Verticillium lecanii</i> . Agric. Biol. Chem. 1978, Vol. 42, No. 3, p. 629-635	1-2, 4-5, 7-8, 10-11 3, 6, 9, 12-13
A	SCHMITT M. et al. Binding Sites for Ca ²⁺ -Channel Effectors and Ryanodine in <i>Periplaneta americana</i> — Possible Targets for New Insecticides. Pestic. Sci. 1996, Vol. 48, No. 4, p. 375-388	1-13

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05. 12. 02

国際調査報告の発送日

24.12.02

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP 382173 A2 (MEIJI SEIKA KAISHA LTD.) 1990.08.16 & JP 3-035796 A & US 5116815 A	1-13